

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2019.07.002

· 基础研究 ·

舌鳞癌化疗耐药相关线粒体微小RNA的筛选和鉴定

林欣羽, 陈伟雄, 雷新元, 欧展鹏, 范松, 李劲松

中山大学孙逸仙纪念医院口腔颌面外科, 广东 广州(510120)

【摘要】 目的 探讨舌鳞癌细胞线粒体微小RNA(mitochondrial microRNAs, mitomiRs)的表达,筛选出与化疗耐药相关的 mitomiRs。方法 提取舌鳞癌细胞系 CAL-27 及其顺铂耐药细胞株 CAL-27-re 的线粒体、细胞质、总细胞 RNA,采用高通量 miRNA 芯片筛选出耐药和亲本细胞中差异表达的 mitomiRs,应用 qRT-PCR 验证在 CAL-27 和 CAL-27-re 中表达上调的 mitomiRs,并在化疗耐药及敏感的舌鳞癌患者样本中验证表达上调的 mitomiRs。结果 芯片结果显示,在 CAL-27 和 CAL-27-re 的线粒体、细胞质和总细胞 RNA 共 6 个组分中共检测到 263 个 miRNA,其中共有 57 个 mitomiRs 和 134 个细胞质微小 RNA(cytoplasmic microRNAs, cytomiRs);与总 miRNA 相比,CAL-27-re 细胞中有 35 个 mitomiRs 表达上调,CAL-27 细胞中有 31 个 mitomiRs 表达上调(≥ 1.5 倍)。进一步比较分析亲本和耐药细胞中差异表达的 mitomiRs,在 CAL-27-re 细胞中有 miR-2392、miR-4462、miR-1290、miR-4449、miR-1268a、miR-1246、miR-371a-5p、miR-3934-5p、miR-4271、miR-513p、miR-664b-3p 共 11 个 mitomiRs 表达上调;而 5 个表达下调的 mitomiRs 则分别是 miR-188-5p、miR-1973、miR-3653、miR-4499、miR-5787;其他 41 个 mitomiRs 在两种细胞株中的表达水平几乎相同。qRT-PCR 与 miRNAs 芯片结果相符合,并且在 CAL-27 和 CAL-27-re 中得到验证的 11 个表达上调的 mitomiRs 中,有 miR-1268a、miR-2392、miR-4462、miR-1290、miR-4449 共 5 个 mitomiRs 在化疗耐药舌鳞癌临床样本中也同样表达上调。结论 顺铂化疗耐药和敏感的舌鳞癌细胞中存在差异表达的 mitomiRs,特异高表达的 mitomiRs: miR-1268a、miR-2392、miR-4462、miR-1290、miR-4449 可能在舌鳞癌化疗耐药中具有重要作用。

【关键词】 线粒体 miRNAs; 化疗耐药; 线粒体转录; 舌鳞癌; 高通量; miRNA 芯片; miRNA 表达谱

【中图分类号】 R739.8 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2019)07-0417-06

【引用著录格式】 林欣羽,陈伟雄,雷新元,等.舌鳞癌化疗耐药相关线粒体微小RNA的筛选和鉴定[J].口腔疾病防治,2019,27(7):417-422.

Screening and identification of mitochondrial miRNAs related to chemotherapy resistance in tongue squamous cell carcinoma LIN Xinyu, CHEN Weixiong, LEI Xinyuan, OU Zhanpeng, FAN song, LI Jinsong. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Sun Yat-Sen Memorial Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510120, China

Corresponding author: LI Jinsong, Email: 860340417@qq.com, Tel: 86-20-81332471

【Abstract】 Objective To investigate the differential expression of mitochondrial microRNAs (mitomiRs) in tongue squamous cell carcinoma (TSCC) and to screen out mitomiRs related to chemotherapy resistance. **Methods** Mitochondrial, cytoplasmic, and total cellular RNAs were extracted from the squamous cell carcinoma cell line CAL-27 and the cisplatin-resistant cell line CAL-27-re. High-throughput miRNA microarrays were used to screen for differentially expressed mitomiRs between the drug-resistant and parental cells. The upregulated mitomiRs in the CAL-27 and CAL-27-re cells and in samples from chemoresistant and chemosensitive tongue squamous cell carcinoma patients were verified by qRT-PCR. **Results** The microarray detected 263 miRNAs in 6 components of the mitochondrial, cytoplasmic and

【收稿日期】 2019-03-03; **【修回日期】** 2019-04-23

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81872194, 81672676, 81772890)

【作者简介】 林欣羽, 医师, 硕士研究生在读, Email: 860340417@qq.com

【通信作者】 李劲松, 教授, 博士, Email: lijinsong1967@163.com, Tel: 86-20-81332471

total cellular RNAs from the CAL-27 and CAL-27-re cells, including 57 mitomiRs and 134 cytoplasmic microRNAs (cytomiRs). Compared with the total miRNAs, 35 mitomiRs were upregulated in the CAL-27-re cells, and 31 mitomiRs were upregulated in the CAL-27 cells (≥ 1.5 -fold). Further comparative analysis of mitomiRs that were differentially expressed between the parental and drug-resistant cells identified 11 upregulated mitomiRs (miR-2392, miR-4462, miR-1290, miR-4449, miR-1268a, miR-1246, and miR-371a-5p, miR-3934-5p, miR-4271, miR-513p, and miR-664b-3p) and 5 downregulated mitomiRs (miR-188-5p, miR-1973, miR-3653, miR-4499, and miR-5787); the expression levels of the other 41 mitomiRs were almost identical in both cell lines. The qRT-PCR results were consistent with the miRNA microarray results. The 11 upregulated mitomiRs that were validated between the CAL-27 and CAL-27-re cells included miR-1268a, miR-2392, miR-4462, and miR-1290. Additionally, 5 mitomiRs, including miR-4449, were upregulated in the clinical chemotherapy-resistant tongue squamous cell carcinoma samples. **Conclusion** Differentially expressed mitomiRs were found between cisplatin-resistant and cisplatin-sensitive tongue squamous cell carcinoma cells. mitomiRs with high expression levels (miR-2392, miR-4462, miR-1290, miR-4449 and miR-1268a) may play important roles in the drug resistance of tongue squamous cell carcinoma.

【Key words】 mitochondrial microRNA; chemoresistance; mitochondrial transcription; tongue squamous cell carcinoma; high throughput; miRNA array; miRNA expression spectrum

J Prev Treat Stomatol Dis, 2019, 27(7): 417-422.

微小RNAs (microRNAs, miRNAs) 作为一类广泛存在于真核生物细胞中的非编码RNA, 其生物学功能和作用机制一直以来都是基础研究关注的重点。除了被人们所熟知的细胞质miRNAs之外, miRNAs也存在于细胞的膜结合区如分泌性小泡^[1-3]和线粒体^[4-6]中, 其中, 线粒体微小RNA (mitochondrial microRNAs, mitomiRs) 因其独特的分布区域以及生理功能近年来获得了越来越多的关注。例如, 在线粒体基因转录本翻译中, mitomiRs和具有切割能力的Argonau2 (AGO2) 蛋白在线粒体基因组翻译中起着重要的作用^[2-3], 更为重要的是, 目前已经有多篇文献报道了miRNAs与肿瘤化疗耐药的相关性, 而且大多是通过调控相关基因的转录后过程从而发挥作用的^[1]。化疗耐药的发生是导致化疗失败的重要原因。为了进一步探讨mitomiRs与化疗耐药之间的关系, 本研究采用高通量miRNA芯片检测化疗耐药及化疗敏感舌鳞癌中mitomiRs的表达, 并进一步进行qRT-PCR验证, 筛选出可能与化疗耐药相关的mitomiRs, 为下一步研究mitomiRs对舌鳞癌化疗耐药的具体调控机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

南美胎牛血清 (BI, 以色列), DMEM培养基 (Gibco, 美国), 顺铂及MTT试剂盒 (Sigma, 美国); RIPA缓冲液 (Sigma, 美国), 聚偏二氟乙烯 (PVDF)

膜 (BioRad, 美国), β -actin、GAPDH、ND5抗体 (Proteintech, 美国), TOM20抗体 (Millipore, 美国), CYTB抗体 (Abcam, 美国), HRP标记山羊抗小鼠IgG (H+L)、HRP标记山羊抗兔IgG (H+L) 二抗 (Proteintech, 美国)、ECL发光液 (GE, 美国); DNA提取试剂盒 (Applied Biosystems, 美国); TRIzol和TRIzol LS (Life Technologies, 美国)、SYBR Green real-time PCR Master Mix (Toyobo, 日本)、U6及11个mitomiRs和34个细胞质miRNA的内参引物 (锐博生物), LightCycler 480 (Roche, 瑞士); Agilent human miRNA (8*60K) V19.0芯片 (上海康成生物技术公司)。人舌鳞癌细胞系CAL-27购自美国ATCC细胞库。

1.2 舌鳞癌耐药细胞CAL-27-re和亲本细胞CAL-27线粒体miRNA的筛选

1.2.1 细胞培养 稳定的顺铂耐药株CAL-27-re根据本课题组前期研究的方法诱导, 其顺铂耐药浓度范围约为 10^{-7} mol/L到 10^{-5} mol/L^[7]。CAL-27和CAL-27-re用含10%胎牛血清的DMEM培养基培养。

1.2.2 分离线粒体、细胞质和细胞核 预冷的PBS洗涤细胞两次, 将沉淀悬浮在含有蛋白酶抑制剂的裂解缓冲液中。之后细胞匀浆, 4°C , 750 g离心5 min以收集细胞核和碎片。再次 4°C , 10 000 g离心15 min收集富含线粒体的重膜颗粒, 上清即为胞浆。

1.2.3 蛋白、RNA和DNA提取 蛋白提取: PBS漂

洗细胞 5 min × 3 次,加入含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 缓冲液。4 °C 静置 0.5 h,随后 4 °C, 12 000 rpm 离心 20 min。上清液即为总蛋白。并分别从其中提取胞质及线粒体蛋白。RNA 提取:TRIzol 法提取总 RNA,并分别用 TRIzol 和 TRIzol LS 对线粒体、细胞核和胞质进行 RNA 提取。DNA 提取:使用 DNA 提取试剂盒进行线粒体 DNA 提取。分别行 Western blot 和 qRT-PCR,检测提取的线粒体纯度。

1.2.4 免疫蛋白印迹法 提取的蛋白在 8% 或 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离,转膜封闭后,加入 β-actin、GAPDH、TOM20、CYTB、ND5 一抗,工作浓度均为 1:1 000,4 °C 孵育过夜,次日 TBST 漂洗,加入山羊抗小鼠、山羊抗兔的二抗,工作浓度均为 1:2 000,室温孵育 1 h,TBST 漂洗后使用化学发光法观察。

1.2.5 qRT-PCR 使用 SYBR Green real-time PCR Master Mix 在 LightCycler 480 中进行 qRT-PCR 实验。反应条件设置为 95 °C 1 min,95 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 30 s,一共 40 个循环。β-actin 和 GAPDH 作为胞浆对照,CYTB 和 ND5 作为线粒体对照,内参的表达均设为 1。引物序列如表 1 所示。

表 1 qRT-PCR 引物序列

引物	序列(5'→3')
β-actin-F	5'-CTACCTCATGAAGATCCTCACCGA-3'
β-actin-R	5'-TTCTCCTTAATGTCACGCACGATT-3'
GAPDH-F	5'-GGACCTGACCTGCCGTCTAG-3'
GAPDH-R	5'-GTAGCCCAGGATGCCCTTGA-3'
CYTB-F	5'-CAAACCTAGGAGCGCTCTTG-3'
CYTB-R	5'-CTGTTGTCCTCCGATTCAG-3'
ND5-F	5'-CTATCACCACCTGTTCGCAG-3'
ND5-R	5'-GTGTTGTTGATGCCGATTG-3'

1.2.6 miRNA 基因芯片 使用 Agilent human miRNA (8*60 K) V19.0 芯片。检测到的 miRNA 包括细胞质 miRNA、mitomiRs 和总 miRNA。

1.3 差异表达 mitomiRs 在舌鳞癌细胞及临床样本中的验证

1.3.1 RNA 提取 实验方法同 1.2 中内容。

1.3.2 标本收集及原代细胞培养 本研究共收集 2017 年 2 月—2018 年 11 月 5 例化疗耐药及 4 例化疗敏感患者舌鳞癌原发灶标本,均为 III 期或 IV 期患者,并均于术前接受了 12 个周期的新辅助化疗。具体新辅助化疗方案如下:第 1 天使用 75 mg/m² 顺铂和 75 mg/m² 多西他赛治疗,同时第 1 天至第

5 天使用 750 mg/m² 氟尿嘧啶,在肿瘤切除前通过 CT 或 MRI 影像学检查评估肿瘤对新辅助化疗的反应。根据世界卫生组织的“实体瘤化疗反应评估标准”(response evaluation criteria in solid tumors),具有进展或稳定的舌鳞癌被定义为化疗耐药舌鳞癌,而部分或完全缩小的舌鳞癌被定义为化疗敏感舌鳞癌。从手术切除的化疗耐药和化疗敏感舌鳞癌标本中分离原代细胞培养,并在传代 5 代内提取线粒体。

1.3.3 原代细胞半数抑制浓度(IC₅₀)检测 为检测化疗耐药原代细胞的顺铂耐药性,将化疗耐药患者及化疗敏感患者的原代细胞分别接种于 96 孔板,调整浓度为 5 × 10³ 个/孔,之后按浓度梯度分别加入 10⁻⁷、5 × 10⁻⁷、10⁻⁶、5 × 10⁻⁶、10⁻⁵、5 × 10⁻⁵、10⁻⁴、5 × 10⁻⁴、10⁻³ mol/L 的顺铂,每种浓度均设置 3 个复孔。置于培养箱内培养 48 h 后去除培养液,每孔加入 20 mL MTT 溶液(5 mg/mL,即 0.5% MTT),继续培养 4 h 后每孔加入 100 μL DMSO。在酶标仪上检测波长为 490 nm 时的各孔吸光度(OD)值,计算 IC₅₀。

1.3.4 qRT-PCR 实验方法同 1.2 中内容。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析,两组间计量资料采用 student't 检验,各组间的多重比较进行单因素方差分析。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

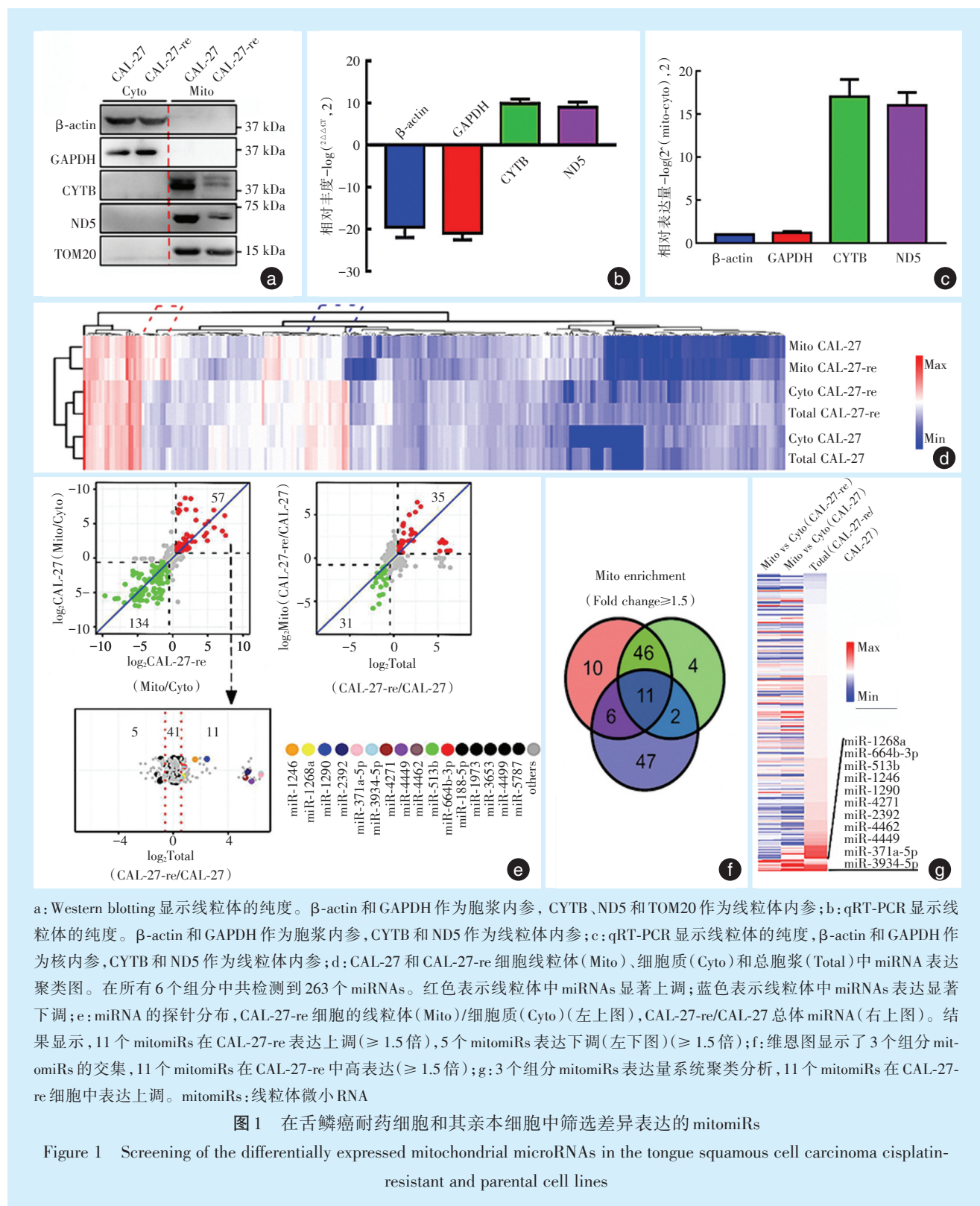
2 结果

2.1 CAL-27-re 和 CAL-27 mitomiRs 的筛选

为探讨 mitomiRs 与化疗耐药的关系,采用高通量 miRNA 芯片筛选出在舌鳞癌顺铂耐药细胞及亲本细胞中差异表达 mitomiRs。①在蛋白、mRNA 和 DNA 水平上证实了线粒体的纯度(图 1a ~ 1c)。②从 CAL-27-re 和 CAL-27 的线粒体、细胞质和总细胞中提取 RNA 进行高通量 miRNA 芯片检测。在 CAL-27-re 和 CAL-27 的线粒体、细胞质和总细胞 RNA 共 6 个组分中共检测到 263 个 miRNA(图 1d),其中包括 57 个 mitomiRs 和 134 个细胞质 miRNA(图 1e)。与总 miRNA 相比,CAL-27-re 细胞中有 35 个 mitomiRs 表达上调,CAL-27 细胞中有 31 个 mitomiRs 表达上调(≥1.5 倍)(图 1e)。③CAL-27 和 CAL-27-re 细胞的 mitomiRs 相比,在 CAL-27-re 细胞中有 miR-1246、miR-1268a、miR-1290、miR-2392、miR-371a-5p、miR-3934-5p、miR-4271、miR-4449、miR-4462、miR-513p、miR-664b-3p 共 11 个 mitomiRs

表达上调, 5个表达下调 mitomiRs 则分别是 miR-188-5p、miR-1973、miR-3653、miR-4499、miR-5787。

41个 mitomiRs 在两株细胞中的表达水平几乎相同(图 1e~1g)。



2.2 验证 mitomiRs 在舌鳞癌细胞及临床样本中的表达

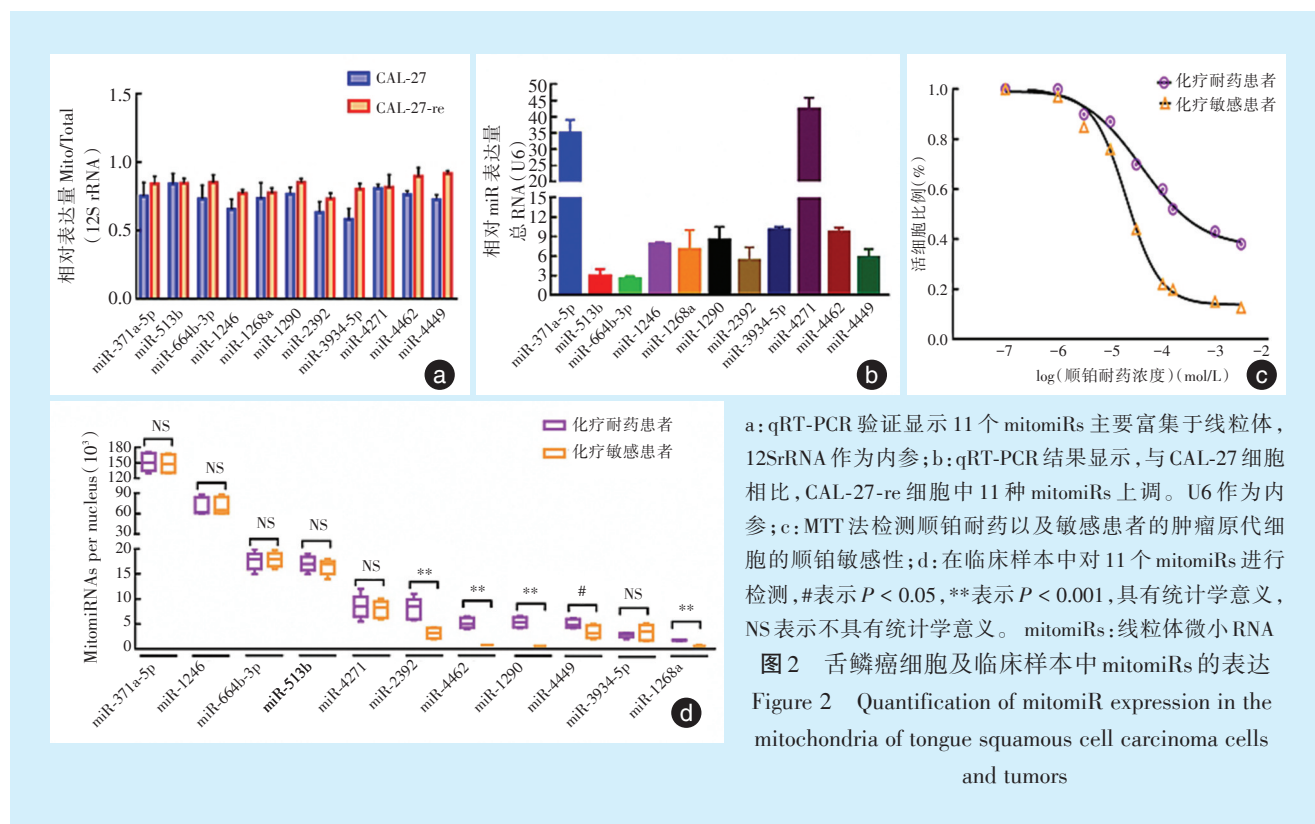
2.2.1 验证 mitomiRs 在舌鳞癌细胞中的表达 采

用 qRT-PCR 在纯化的线粒体中验证了在舌鳞癌耐药细胞高表达的 11 个 mitomiRs 主要富集于线粒体中(图 2a)。同时, 在 CAL-27 细胞中利用 qRT-PCR

再次验证了这11个在耐药细胞中高表达的 mitomiRs(图2b)。

2.2.2 验证 mitomiRs 在临床样本中的表达 为了进一步探讨上述结果的临床相关性,收集了化疗耐药和化疗敏感的舌鳞癌患者标本,分离原代细胞,采用MTT法检测原代培养细胞的顺铂耐药性,证实化疗耐药标本的肿瘤原代细胞较化疗敏感标

本的原代细胞的IC₅₀升高了3倍(图2c),在5代内分离线粒体并提取RNA,采用qRT-PCR检测,结果显示在CAL-27-re中表达上调的11个 mitomiRs 中有5个:miR-2392、miR-4462、miR-1290、miR-4449、miR-1268a在临床样本中也表达上调(图2d),提示其具有更为重要的临床意义。



3 讨论

舌鳞癌是头颈鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)中的最常见的种类,因其具有较强的侵袭性且其死亡率较高,因而从分子层面出发的治疗手段相关的研究具有重要的临床意义^[8]。顺铂作为头颈鳞状细胞癌化疗的一线治疗药物,通常在化疗的初始阶段都有比较好的疗效,但在后续治疗中出现顺铂耐药的可能性超过了70%,从而导致治疗的失败^[9-10]。顺铂化疗耐药是目前临床上极需攻克的一大难题。现有研究表明,化疗耐药的发生是由多种机制引起的^[11],其中,氧化磷酸化降低以及糖酵解增加都与化疗耐药的发生相关^[12-13]。这提示线粒体在肿瘤化疗耐药中可能起到了非常重要的调控作用。

miRNAs 是一种短小的非编码 RNA,已经有文献报道其在肿瘤细胞中的广泛表达,并且具有非

常重要的生理功能^[14]。例如,部分研究报道了 miRNAs 对于基因转录的直接调控作用,并且与多种癌症的发生和发展及生物学行为的改变有关^[15-16]。除了定位于细胞中的 miRNAs 之外,目前已有 150 多个定位于线粒体中的 miRNAs 被检测到^[17],被统称为 mitomiRs。其大多存在于鼠的肝脏、心肌、人的骨骼肌等。已有研究表明 mitomiRs 相关调控机制为以下几个方面^[16]: ① mitomiRs 能通过抑制线粒体基因 mRNA 的转录从而调节线粒体蛋白组; ② 像乙酰基这样的小分子从细胞质转移到线粒体基质后,可能以共价形式附着在 mitomiRs 上,然后靶向不同的 mRNA; ③ mitomiRs 可以从线粒体基因组转录,在线粒体内部成熟后,抑制线粒体和细胞质区室中的 mRNA 翻译。但有关其在肿瘤中的表达及相关的生理学功能则甚少报道。本课题组在前期非编码 RNA 对舌鳞癌顺铂耐药调控

作用相关课题的研究基础上,进一步研究 mitomiRs 与舌鳞癌顺铂耐药的相关性。

本研究利用高通量 miRNA 芯片筛选出 11 个在化疗耐药舌鳞癌细胞中显著高表达的 mitomiRs 及 5 个表达显著下调的 mitomiRs,并在临床样本中验证这 11 个 mitomiRs 的表达情况。实验结果表明,在这 11 个 mitomiRs 中,有 5 个 mitomiRs 在顺铂耐药的舌鳞癌患者标本中也显著升高。上述结果再一次证实了 mitomiRs 与化疗耐药的相关性,并且,这 5 个 mitomiRs 具有更为显著的临床意义,提示可能通过调控线粒体基因组转录等方式进而干预了舌鳞癌的顺铂敏感性。关于其调控舌鳞癌顺铂敏感性的具体机制将是本课题下一阶段所要探讨的主要内容。此外,在化疗耐药舌鳞癌细胞系中筛选出的 5 个表达下调的 mitomiRs 也将在下一阶段进行更深入的研究。

参考文献

- [1] Das S, Ferlito M, Kent OA, et al. Nuclear miRNA regulates the mitochondrial genome in the heart[J]. *Circ Res*, 2012, 110(12): 1596-1603.
- [2] Zhang XR, Zuo XX, Yang B, et al. MicroRNA directly enhances mitochondrial translation during muscle differentiation[J]. *Cell*, 2014, 158(3): 607-619.
- [3] Nouws J, Shadel GS. Micromanaging mitochondrial translation[J]. *Cell*, 2014, 158(3): 477-478.
- [4] Chae YC, Vaira V, Caino MC, et al. Mitochondrial Akt regulation of hypoxic tumor reprogramming[J]. *Cancer Cell*, 2016, 30(2): 257-272.
- [5] Kren BT, Wong PY, Sarver A, et al. microRNAs identified in highly purified liver-derived mitochondria may play a role in apoptosis [J]. *RNA Biol*, 2009, 6(1): 65-72.
- [6] Sripada L, Tomar D, Prajapati P, et al. Systematic analysis of small RNAs associated with human mitochondria by deep sequencing: detailed analysis of mitochondrial associated miRNA[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e44873.
- [7] Sun L, Yao Y, Liu B, et al. MiR-200b and miR-15b regulate chemotherapy-induced epithelial-mesenchymal transition in human tongue cancer cells by targeting BMI1[J]. *Oncogene*, 2012, 31(4): 432-445.
- [8] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(1): 7-30.
- [9] Shen DW, Pouliot LM, Hall MD, et al. Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes[J]. *Pharmacol Rev*, 2012, 64(3): 706-721.
- [10] Qin X, Guo H, Wang X, et al. Exosomal miR-196a derived from cancer-associated fibroblasts confers cisplatin resistance in head and neck cancer through targeting CDKN1B and ING5[J]. *Genome Biol*, 2019, 20(1): 12-14.
- [11] Lue HW, Podolak J, Kolahi K, et al. Metabolic reprogramming ensures cancer cell survival despite oncogenic signaling blockade[J]. *Genes Dev*, 2017, 31(20): 2067-2084.
- [12] Fan S, Liu BD, Sun LJ, et al. Mitochondrial fission determines cisplatin sensitivity in tongue squamous cell carcinoma through the BRCA1-miR-593-5p-MFF axis[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(17): 14885-14904.
- [13] Rodriguez-Enriquez S, Carreno-Fuentes L, Gallardo-Perez JC, et al. Oxidative phosphorylation is impaired by prolonged hypoxia in breast and possibly in cervix carcinoma[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(10): 1744-1751.
- [14] Zhao L, Liu W, Xiao J, et al. The role of exosomes and "exosomal shuttle microRNA" in tumorigenesis and drug resistance[J]. *Cancer Lett*, 2015, 356(2): 339-346.
- [15] Leung EY, Kim JE, Askarian-Amiri M, et al. Hormone resistance in two MCF-7 breast cancer cell lines is associated with reduced mTOR signaling, decreased glycolysis, and increased sensitivity to cytotoxic drugs[J]. *Front Oncol*, 2014, 4(7): 221-230.
- [16] Bienertova-Vasku J, Sana J, Slaby O. The role of microRNAs in mitochondria in cancer[J]. *Cancer Lett*, 2013, 336(1): 1-7.
- [17] Bandiera S, Matégot R, Girard M, et al. MitomiRs delineating the intracellular localization of microRNAs at mitochondria[J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 64(3): 12-19.

(编辑 张琳,曾曙光)